

-JR

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

(11) N° de publication :
(a n'utiliser que pour les commandes de reproduction)

2 728 905

(21) N° d'enregistrement national :

94 15838

(51) Int Cl⁶ : C 07 K 14/32, C 12 N 15/55, 1/21, C 12 P 21/02, 7/40

CETTE PAGE ANNULE ET REMPLACE LA PRECEDENTE

(12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 29.12.94.

(71) Demandeur(s) : RHONE POULENC NUTRITION ANIMALE — FR.

(30) Priorité :

(43) Date de la mise à disposition du public de la demande : 05.07.96 Bulletin 96/27.

(72) Inventeur(s) : DION MICHEL, BATISSE NADINE, WEIGEL PIERRE, LECOCQ FRANCOISE MICHELE, HALLET JEAN NOEL et SAKANYAN VEHARY.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de recherche préliminaire : Se reporter à la fin du présent fascicule.

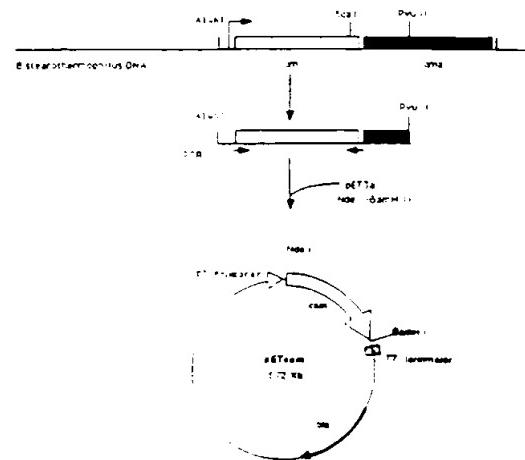
(73) Titulaire(s) :

(60) Références à d'autres documents nationaux apparentés :

(74) Mandataire : RHONE POULENC RORER SA.

(54) NOUVELLE ACIDE AMINE AMIDOHYDROLASE, SEQUENCE NUCLOTIDIQUE CORRESPONDANT ET LEURS UTILISATIONS.

(57) La présente invention concerne une nouvelle acide aminé amidohydrolase, la séquence nucléotidique correspondante, les vecteurs et cellules correspondantes et l'utilisation de cette enzyme pour l'hydrolyse stéréosélective de dérivés N-acylés L-acides aminés.



FR 2 728 905 - A1



NOUVELLE ACIDE AMINE AMIDOHYDROLASE, SEQUENCE
NUCLEOTIDIQUE CORRESPONDANTE ET LEURS UTILISATIONS

La présente invention concerne une nouvelle acide aminé amidohydrolase, la 5 séquence nucléotidique codant pour cette enzyme, des plasmides d'expression correspondants et l'utilisation de cette enzyme.

Les acides aminés amidohydrolases sont des enzymes responsables chez les plantes, les animaux et les microorganismes de l'hydrolyse des résidus acyles des acides aminés. C'est ainsi que l'acétylornithine déacétylase catalyse la conversion de la 10 N²-acétyle L-ornithine en L-ornithine dans le processus de biosynthèse de l'arginine chez certaines bactéries. De par leur spécificité énantiomérique, ces enzymes sont particulièrement intéressantes sur le plan industriel et sont notamment utilisées à ce titre pour la production sélective de stéréoisomères à partir de mélanges racémates.

Malheureusement, ces acides aminés amidohydrolases possèdent très souvent 15 des spécificités étroites de substrat, de température et/ ou de pH qui empêchent leur utilisation de manière très générale. Par exemple, une souche d'*Escherichia coli* comportant le gène codant pour l'acétylornithine déacétylase est incapable d'hydrolyser des dérivés d'acides aminés aromatiques N-acylés.

Récemment, la Demanderezse a découvert et caractérisé, sur un fragment 20 d'ADN de la souche *Bacillus stearothermophilus* NCIB8224, la présence d'un gène aminoacylase codant pour une acide aminé amidohydrolase hydrolysant des motifs N-acétyle des L-acides aminés (V.Sakanyan et al. 1993, *Applied and Environmental Microbiology* 59(11), 3878-3888.). Cette enzyme est thermostable et possède avantageusement un optimum d'activité à 70°C. Outre cette qualité, elle hydrolyse 25 efficacement une grande variété de N-acyle L-acides aminés, comme N-acétyle, N-formyle, N-chloracetyl, mais pas N-carbamoyle.

La présente invention a précisément pour objet de proposer une nouvelle acide aminé amidohydrolase avantageusement stéréospécifique et thermostable, efficace vis à vis d'acides aminés N-carbamoylés.

30 Dans le cadre de la présente invention, la demanderezse a localisé et caractérisé en amont du gène codant pour l'aminoacylase ci-avant, un second cadre de

lecture correspondant à une séquence nucléotidique codant pour une seconde acide aminé amidohydrolase. Il s'agit plus précisément d'une acide aminé amidohydrolase spécifique de l'hydrolyse des motifs N-carbamoyle des L-acides aminés, que nous appellerons ci-après carbamoylase ; le gène correspondant sera désigné *cav*.

5 La présente invention a pour premier objet une carbamoylase exprimée par la souche *Bacillus stearothermophilus* NCIB 8224 et capable d'hydrolyser des motifs N-carbamoyle des L-acides aminés.

10 Elle décrit en particulier l'isolement et la caractérisation du gène codant pour une telle enzyme. Ce gène a été cloné, séquencé et exprimé chez *E. coli* et son activité enzymatique caractérisée.

La présente invention concerne plus particulièrement une carbamoylase caractérisée en ce qu'elle possède la séquence d'acides aminés représentée en SEQ ID N°1.

15 La comparaison de cette séquence avec des séquences disponibles sur base de données a permis de mettre en évidence des homologies significatives avec respectivement la séquence codant pour l'amidohydrolase des N-carbamoyle des L-acides aminés de la souche *Pseudomonas* sp. NS671 (Watabe et al. 1992, *Journal of Bacteriology* 174(3), 962-969) et la séquence codant pour la carbamoylase de la souche *Bacillus stearothermophilus* NS112A (Mukohara et al. 1993, *Biosci. Biotech. Biochem* 57(11), 1935-1937.) et d'établir ainsi son activité carbamoylase.

La carbamoylase revendiquée est avantageusement active à une température de l'ordre de 55°C et présente une L-stéréospécificité.

La présente invention a également pour objet une séquence nucléotidique codant pour une carbamoylase selon l'invention.

25 Plus précisément, il s'agit de la séquence nucléotidique représentée en SEQ ID N°1. De préférence, elle est de l'ordre de 1,2 kb.

Un autre objet de la présente invention concerne un ADN recombinant comprenant au moins une séquence nucléotidique telle que revendiquée.

Selon un mode préféré de l'invention, la séquence nucléotidique ci-avant fait partie d'un vecteur d'expression qui peut être à réPLICATION AUTONOME ou intégratif.

L'invention a également pour objet toute cellule recombinante contenant une séquence nucléotidique et/ou un vecteur tels que définis ci-avant. Les cellules recombinantes selon l'invention peuvent être aussi bien des cellules eucaryotes que procaryotes. Parmi les cellules eucaryotes qui conviennent, on peut citer les cellules animales, les levures, ou les champignons. En particulier, s'agissant de levures, on peut citer les levures du genre *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Schwanniomyces*, ou *Hansenula*. S'agissant de cellules animales, on peut citer les cellules COS, CHO, CI27, les œufs de Xénope, etc. Parmi les champignons, on peut citer plus particulièrement *Micromonospora*, *Aspergillus* ssp. ou *Trichoderma* ssp. De préférence, il s'agit de cellules procaryotes. A ce titre on peut plus particulièrement utiliser les bactéries suivantes *Actinomycètes*, *Bacillus* et *Staphylococcus*, et plus préférentiellement *E.coli*. Les cellules recombinantes de l'invention peuvent être obtenues par toute méthode permettant d'introduire une séquence nucléotidique étrangère dans une cellule. Il peut s'agir notamment de transformation, électroporation, conjugaison, fusion de protoplastes, ou toute autre technique connue de l'homme de l'art.

La présente invention a également pour objet un procédé de préparation de la carbamoylase revendiquée à partir de la culture d'une de ces cellules recombinantes. La carbamoylase ainsi obtenue, est récupérée selon des méthodes classiques à l'issue de la culture. Selon un mode particulier de ce procédé, l'expression du gène codant pour la carbamoylase de *B. stearothermophilus* NCIB 8224 est placée sous contrôle d'un promoteur du bactériophage T7. Il en résulte une expression nettement améliorée de l'enzyme. Elle est environ 1000 fois plus importante que dans la souche d'*E. coli* contenant un plasmide recombinant avec le gène de la carbamoylase mais sans le système d'expression T7.

La présente invention vise également un procédé enzymatique pour hydrolyser des N-carbamoyle L-acides aminés en L-acides aminés correspondants mettant en oeuvre une carbamoylase selon l'invention exprimée *in situ* ou non à partir d'une cellule comportant au moins un gène selon l'invention.

Selon un mode particulier de ce procédé, l'hydrolyse est conduite en présence de sels métalliques et plus préférentiellement de sels de cobalt. Ce mode de réalisation est décrit plus en détail en exemple 3 ci-après.

La carbamoylase selon l'invention est tout particulièrement utile pour
5 préparer de la L-méthionine.

Les exemples et la figure qui suivent, sont présentés à titre illustratif et non limitatif de la présente invention et mettent en évidence d'autres avantages de celle-ci.

FIGURE

Figure 1 : Construction du plasmide pETcam.

10

MATERIEL ET METHODES

A. Souches, plasmides et réactifs :

Les souches *E. coli* XS1D2 (Mountain *et al.*, 1984, *Molecular and General Genetics* 197 ; 82-89.) et JM101 (Yanish-Peron *et al.*, 1985, *Gene* 33 ; 103-109.) ont été
15 respectivement utilisées pour les constructions de pBC8 et du plasmide d'expression. La souche *E. coli* BL21 Ω (DE3) qui porte le gène T7 de l'ARN polymérase sous le contrôle du promoteur *LacUV5* dans son chromosome (Studier *et al.*, 1990, *Meth. Enzymol.* 185 ; 60-89.) est utilisée comme hôte d'expression. *B. stearothermophilus* NCIB8224 est une souche du laboratoire (qui provient elle-même de l'"All Union
20 Collection of Microorganisms", Moscou). Le vecteur d'expression pET3a a été obtenu auprès de Novagen (Studier *et al.*, 1990, *Meth. Enzymol.* 185 ; 60-89.). Les acides aminés N-carbamoyle sont de chez Sigma sauf les N-carbamoyle methionine de série D, L-, D- et L- qui ont été synthétisées en laboratoire selon des protocoles classiques. Les enzymes de restriction, l'ADN ligase et l'isopropyl- β -D-
25 thiogalactopyranoside (IPTG) sont de chez Boehringer Mannheim. L'ADN Taq polymérase et les oligodéoxynucleotides sont de chez Eurogentec.

B. Construction de pETcam

Le plasmide d'expression pETcam est obtenu par clonage dans le vecteur pET3a du fragment correspondant à la région codant pour *cam*, amplifié par la réaction de polymérisation en chaîne (PCR). Sa construction est représentée schématiquement sur la figure 1.

Les séquences oligodéoxynucléotide 24-mer et 29-mer utilisées pour amplifier la région codant pour le gène *cam* sont 5'-AACATATGATTCAAGGGAACGTC-3' et 5'-GCGGATCCTCGTTGTCTTTTCGTTATT-3'. Des séquences supplémentaires 5'-sont présentes sur toutes les amorces et correspondent aux sites des enzymes de restriction. Le fragment d'ADN *cam* AlwN I-Pvu II du plasmide pBC8 (obtenu selon l'exemple 1) a été utilisé pour l'amplification de la région codant pour le gène *cam*. Les produits de la PCR sont isolés, leurs extrémités sont rendues franches à l'aide de la sous unité Klenow de l'ADN polymérase. Ils sont ensuite clonés dans le vecteur pUC18 lui-même digéré par l'enzyme Sma I et déphosphorylé. Cette étape permet la digestion NdeI-BamHI de la région codant pour *cam* qui est ensuite clonée dans le vecteur d'expression pET3a prédigéré en NdeI-BamHI. On obtient ainsi pETcam.

20 C. Protocole d'identification de la protéine carbamoylase par SDS-PAGE

Des culots cellulaires provenant de 200 µl de milieu de culture sont resuspendus dans 100 µl de tampon (Laemmli *et al.*, 1970, *Nature* 227 ; 660-685) et soniqués. Classiquement, environ 10 µl (soit près de 20 µg de protéines totales) sont disposés sur le gel. Après migration (3 h) les protéines sont visualisées par coloration au bleu de Coomassie.

D. Méthode pour évaluer l'activité carbamoylase

Des culots cellulaires provenant de 0,5 ml de culture sont resuspendus dans le même volume de tampon Tris-HCl (10 mM, pH 7,4) et lysés par sonication pendant 10 minutes. Classiquement 10 µl (environ 10 µg de protéines totales) de la suspension ainsi obtenue sont utilisés pour doser l'activité enzymatique dans un volume de 200 µl. La réaction se fait en présence de tampon phosphate (50 mM, pH 7,5), CoCl₂ (1 mM) et de substrat N-carbamoyl D, L-méthionine 50 mM. Après

15-20 minutes d'incubation à 55°C la réaction est arrêtée en ajoutant 100 µl d'H₃PO₄ 0,6 M. L'activité carbamoylase est évaluée en quantifiant la méthionine produite lors de la réaction, après séparation du milieu réactionnel en phase inverse (colonne Kontron, Sphérisorb S5 ODS 2, 250x5 mm) par HPLC (Système Kontron comprenant un passeur d'échantillons, autosampler 460 : injection de 20 µl, une pompe, Pump 420 et Gradient former 425). L'élution est réalisée en présence du mélange Méthanol-H₃PO₄ (100 mM)/10%-90% (v/v). La détection des produits se fait à 215 nm (DéTECTEUR, UVIKON 740 LC). Une gamme d'étalonnage permet d'estimer la quantité de méthionine formée en fonction de la surface des pics. En présence de substrats N-carbamoyle D, L-alanine ou N-carbamoyle D, L-leucine, lalanine et la leucine sont quantifiées par dosage colorimétrique (réactif à la ninhydrine : la coloration est obtenue à 70°C, température à laquelle le substrat N-carbamoyl ne réagit pas avec le réactif utilisé).

E. Séquençage de l'ADN

15 Le séquençage de l'ADN codant pour la carbamoylase a été effectué selon la méthode de Sanger (Sanger, 1981, *Science*, 214, 1205-1210).

EXEMPLE 1

20 - Isolement et détermination de la séquence du gène codant pour la carbamoylase revendiquée.

L'ADN génomique de la souche de *B. stearothermophilus* NCIB 8224 a été digéré par l'enzyme PstI puis ligaturé avec le vecteur pBR322 digéré par la même enzyme. Après transformation d'*E. coli* XS1D2, les clones ont été sélectionnés par croissance sur milieu synthétique avec tétracycline sans arginine. Tous les plasmides recombinants contenaient un fragment d'ADN de *B.stearothermophilus* de 4,7 kb. L'un d'entre eux a été désigné pBC8. Un sous-fragment de 1230 pb contenant l'intégralité de la séquence codante de la carbamoylase a été séquencé. La séquence est présentée en SEQ ID N°1. La carbamoylase est composée de 409 acides aminés et présente un poids moléculaire attendu de 44 202 daltons.

EXEMPLE 2- Surexpression du gène carbamoylase

Une préculture de *E. coli* BL21Ω (DE3) portant le plasmide pETcam est incubée à 37°C dans un milieu LB contenant de l'ampicilline (100 µg/ml). 0,2 ml de cette culture sont utilisés pour inoculer 20 ml du même milieu. Lorsque la D_{O600 nm} atteint environ 3,0, l'expression de l'ARN polymérase T7 est induite avec 0,1 mM d'IPTG. La culture induite est poursuivie pendant 4 heures supplémentaires. La culture est centrifugée à 12 000 g pendant 3 minutes. Les culots de cellules sont conservées à - 20°C. L'activité enzymatique carbamoylase est appréciée selon la méthode décrite au point D précédent.

Le tableau I ci-après rend compte des résultats obtenus. A titre comparatif y sont également présentées les activités enzymatiques obtenues avec différentes souches contenant ou non le gène *cam*.

	Addition d'IPTG	Activité Carbamoylase µmol de L-méth/h/mg protéine
<i>Bacillus stearothermophilus</i> NCIB 8224	-	0,15
<i>E. coli</i> XS1D2	-	non détectable
<i>E. coli</i> XS1D2 (pBC8)	-	0,4
<i>E. coli</i> BL21Ω(DE3)	-	non détectable
<i>E. coli</i> BL2152Ω(DE3) (pETcam)	+	200 505

15

TABLEAU I :

De ces résultats, il ressort les faits suivants: l'activité détectée dans la souche *B. stearothermophilus* NCIB 8224 cultivée à 55°C en milieu LB est très faible. Les souches d'*E. coli* XS1D2 et BL21Ω(DE3) ne présentent aucune activité carbamoylase. La souche XS1D2 (pBC8) possède une activité faible mais supérieure à celle détectée chez *B. stearothermophilus* NCIB 8224. L'expression du gène *cam* par

le système T7 dans la souche BL21Ω(DE3) (pETcam) fournit une activité beaucoup plus importante, atteignant 505 µmol L-méthionine/h/mg de protéine lorsque la T7 polymérase est induite. En absence d'induction, le niveau d'activité est assez conséquent en raison de la fuite d'expression du gène de la polymérase T7, entraînant ainsi l'expression du gène codant pour la carbamoylase.

La surexpression du gène *cam* dans la souche BL21Ω(DE3) pETcam a été confirmée par l'analyse des protéines totales sur gel de PAGE SDS. Une bande majoritaire correspondant à environ 30 % des protéines totales (analyse densitométrique), possède un poids moléculaire de 44 Kda, en accord avec les données de la séquence de la carbamoylase.

EXEMPLE 3

Caractéristiques enzymatiques de la carbamoylase

La souche *E. coli* BL21Ω(DE3)(pETcam) présentant une forte activité carbamoylase a été utilisée pour toutes les analyses enzymatiques. Les tests ont été effectués avec l'enzyme non purifiée présente dans les extraits bactériens.

La stéréospécificité de l'enzyme a été testée avec les énantiomères de la N-carbamoyle méthionine. L'activité a été trouvée pour la N-carbamoyle L-méthionine mais pas pour la N-carbamoyle D-méthionine. La carbamoylase est donc une enzyme strictement L-stéréospécifique vis-à-vis de la N-carbamoyle-méthionine.

L'enzyme peut également hydrolyser d'autres substrats; l'activité estimée en présence de la N-carbamoyle D,L-alanine et de la N-carbamoyle D,L-leucine représente respectivement 132 % et 25 % de l'activité envers la N-carbamoyle D,L-méthionine.

L'activité de la carbamoylase est augmentée d'au moins 5 fois en présence d'ions cobalt (1 mM) dans le mélange réactionnel par comparaison avec un témoin sans cobalt. L'activité de la carbamoylase est maximale à 55-60°C ce qui est caractéristique des enzymes thermostables.

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATION GENERALE :

5

(i) DEPOSANT:

- (A) NOM : RHONE-POULENC NUTRITION ANIMALE
- (B) RUE : 42, avenue Aristide BRIAND
- (C) VILLE : ANTONY
- (E) PAYS : FRANCE

10

(F) CODE POSTAL : 92160

(ii) TITRE DE L' INVENTION : NOUVELLE AMINO ACIDE AMIDOHYDROLASE,
SEQUENCE NUCLEOTIDIQUE CORRESPONDANTE ET UTILISATIONS.

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 1

15

(iv) FORME LISIBLE PAR ORDINATEUR :

- (A) TYPE DE SUPPORT : Tape
- (B) ORDINATEUR : IBM PC compatible
- (C) SYSTEME D' EXPLOITATION : PC-DOS/MS-DOS
- (D) LOGICIEL : PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (OEB)

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 1:

20

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

- (A) LONGUEUR : 1230 paires de bases
- (B) TYPE : acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS : double
- (D) CONFIGURATION : linéaire

25

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: *Bacillus stearothermophilus*

30

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

35

Met	Ile	Gln	Gly	Glu	Arg	Leu	Trp	Gln	Arg	Leu	Met	Glu	Leu	Gly	Glu
TTG	ATT	CAA	GGG	GAA	CGT	CTT	TGG	CAA	CGG	CTC	ATG	GAA	CTA	GGG	GAG
9		18				27					36			45	

40

Val	Gly	Lys	Gln	Pro	Ser	Gly	Gly	Val	Thr	Arg	Leu	Ser	Phe	Thr	Ala	Glu	Glu
GTC	GGC	AAG	CAA	CCA	AGC	GGC	GGC	GTC	ACG	CGC	CTC	TCG	TTC	ACT	GCT	GAA	GAG
57		66			75			84					93			102	

Arg Arg Ala Lys Asp Leu Val Ala Ser Tyr Met Arg Glu Ala Gly Leu Phe Val
 CGG CGG GCC AAA GAT CTC GTC GCT TCC TAC ATG CGC GAA GCC GGG CTT TTC GTA
 111 120 129 138 147 156

5

Tyr Glu Asp Ala Ala Gly Asn Leu Ile Gly Arg Lys Glu Gly Thr Asn Pro Asp
 TAT GAA GAC GCG CCT GGC AAC TTG ATC GGA CGG AAA GAA GGG ACG AAT CCG GAT
 165 174 183 192 201 210

10

Ala Thr Val Val Leu Val Gly Ser His Leu Asp Ser Val Tyr Asn Gly Gly Cys
 GCC ACG GTC GTC CTT GTT GGA TCT CAT CTC GAT TCG GTT TAC AAC GGC GGC TGC
 219 228 237 246 255 264

15

Phe Asp Gly Pro Leu Gly Val Leu Ala Gly Val Glu Val Val Gln Thr Met Asn
 TTT GAT GGA CCG CTC GGG GTG TTG GCC GGC GTG GAA GTC GTT CAG ACG ATG AAC
 273 282 291 300 309 318

20

Glu His Gly Val Val Thr His His Pro Ile Glu Val Val Ala Phe Thr Asp Glu
 GAG CAC GGT GTG ACG CAC CAC CCA ATT GAA GTA GTG GCG TTC ACT GAC GAA
 327 336 345 354 363 372

25

Glu Gly Ala Arg Phe Arg Phe Gly Met Ile Gly Ser Arg Ala Met Ala Gly Thr
 GAG GGA GCG CGC TTT CGT TTC GGC ATG ATC GGC AGC CGC GCC ATG GCC GGA ACA
 381 390 399 408 417 426

30

Leu Pro Pro Glu Ala Leu Glu Cys Arg Asp Ala Glu Gly Ile Ser Leu Ala Glu
 CTG CCG GAA GCG CTC GAG TGC CGC GAC GCG GAA GGG ATT TCC CTC GCT GAA
 435 444 453 462 471 480

35

Ala Met Lys Gln Ala Gly Leu Asp Pro Asp Arg Leu Pro Gln Ala Ala Arg Lys
 GCG ATG AAA CAG GCG GGG CTT GAC CCG GAC CGC TTG CCG CAG GCA GCG CGA AAA
 489 498 507 516 525 534

40

Pro Gly Thr Val Lys Ala Tyr Val Glu Leu His Ile Glu Gln Gly Arg Val Leu
 CCA GGA ACG GTG AAA GCC TAT GTC GAA TTG CAT ATC GAA CAA GGA CGG GTG CTG
 543 552 561 570 579 588

45

Glu Glu Ala Gly Leu Pro Val Gly Ile Val Thr Gly Ile Ala Gly Leu Ile Trp
 GAG GAG GCT CTT CCA GTT GGC ATC GTC ACT GGC ATC GCC GGT CTG ATT TGG
 597 606 615 624 633 642

50

Val Lys Phe Thr Ile Ala Gly Pro Ala Glu His Ala Gly Ala Thr Pro Met Ser
 GTG AAA TTT ACC ATC GCC GGC CCG GCG GAA CAT GCC GGC GCC ACG CCG ATG TCA
 651 660 669 678 687 696

55

Leu Arg Arg Asp Pro Met Ala Ala Ala Ala Gln Ile Ile Ile Val Ile Glu Glu
 TTG CGG CGC GAC CCG ATG GCG GCG GCC CAG ATC ATC ATA GTG ATC GAA GAG
 705 714 723 732 741 750

	Glu Ala Arg Arg Thr Gly Thr Val Gly Thr Val Gly Gln Leu His Val Tyr
5	GAA GCA AGA CGA ACA GGG ACA ACG GTC GGT ACT GTA GGA CAG TTG CAT GTA TAT
	759 768 777 786 795 804
	Pro Gly Gly Ile Asn Val Ile Pro Glu Arg Val Glu Phe Val Leu Asp Leu Arg
10	CCG GGC GGT ATT AAT GTC ATT CCG GAA CGG GTC GAA TTT GTG CTC GAT TTG CGC
	813 822 831 840 849 858
	Asp Leu Lys Ala Glu Val Arg Asp Gln Val Trp Lys Ala Ile Ala Val Arg Ala
15	GAC TTG AAG GCT GAG GTG CGC GAT CAA GTA TGG AAA GCC ATA GCC GTG CGG GCA
	867 876 885 894 903 912
	Glu Thr Ile Ala Lys Glu Arg Asn Val Arg Leu Thr Thr Glu Arg Leu Gln Glu
20	GAG ACG ATC GCC AAG GAG CGG AAC GTT CGC CTC ACG ACC GAG CGA CTG CAA GAA
	921 930 939 948 957 966
	Met Ala Pro Val Leu Cys Ser Glu Val Val Lys Gln Ala Ala Glu Arg Ala Cys
25	ATG GCG CCG GTG TTA TGT TCC GAG GTG GTG AAA CAG GCC GCG GAA AGA GCG TGC
	975 984 993 1002 1011 1020
	Lys Gln Leu Gly Tyr Pro Pro Phe Trp Leu Pro Ser Gly Ala Ala His Asp Gly
30	AAG CAG CTC GGG TAT CCG CCG TTT TGG CTG CCG AGC GGC GCA GCC CAT GAC GGC
	1029 1038 1047 1056 1065 1074
	Val Gln Leu Ala Pro Ile Cys Pro Ile Gly Met Ile Phe Val Arg Ser Gln Asp
35	GTA CAG TTG GCT CCG ATT TGC CCG ATC GGG ATG ATT TTT GTC CGC TCC CAA GAC
	1083 1092 1101 1110 1119 1128
	Gly Val Ser His Ser Pro Ala Glu Trp Ser Thr Lys Glu Asp Cys Ala Val Gly
40	GGG GTG AGT CAT AGT CCG GCG GAA TGG AGT ACT AAA GAA GAC TGC GCC GTT GGA
	1137 1146 1155 1164 1173 1182
	Ala Glu Val Leu Tyr His Thr Val Trp Gln Leu Ala Gln Gly Glu TER
45	GCA GAG GTG CTT TAT CAT ACA GTG TGG CAA CTG GCC CAA GGG GAA TAA
	1191 1200 1209 1218 1227

REVENDICATIONS

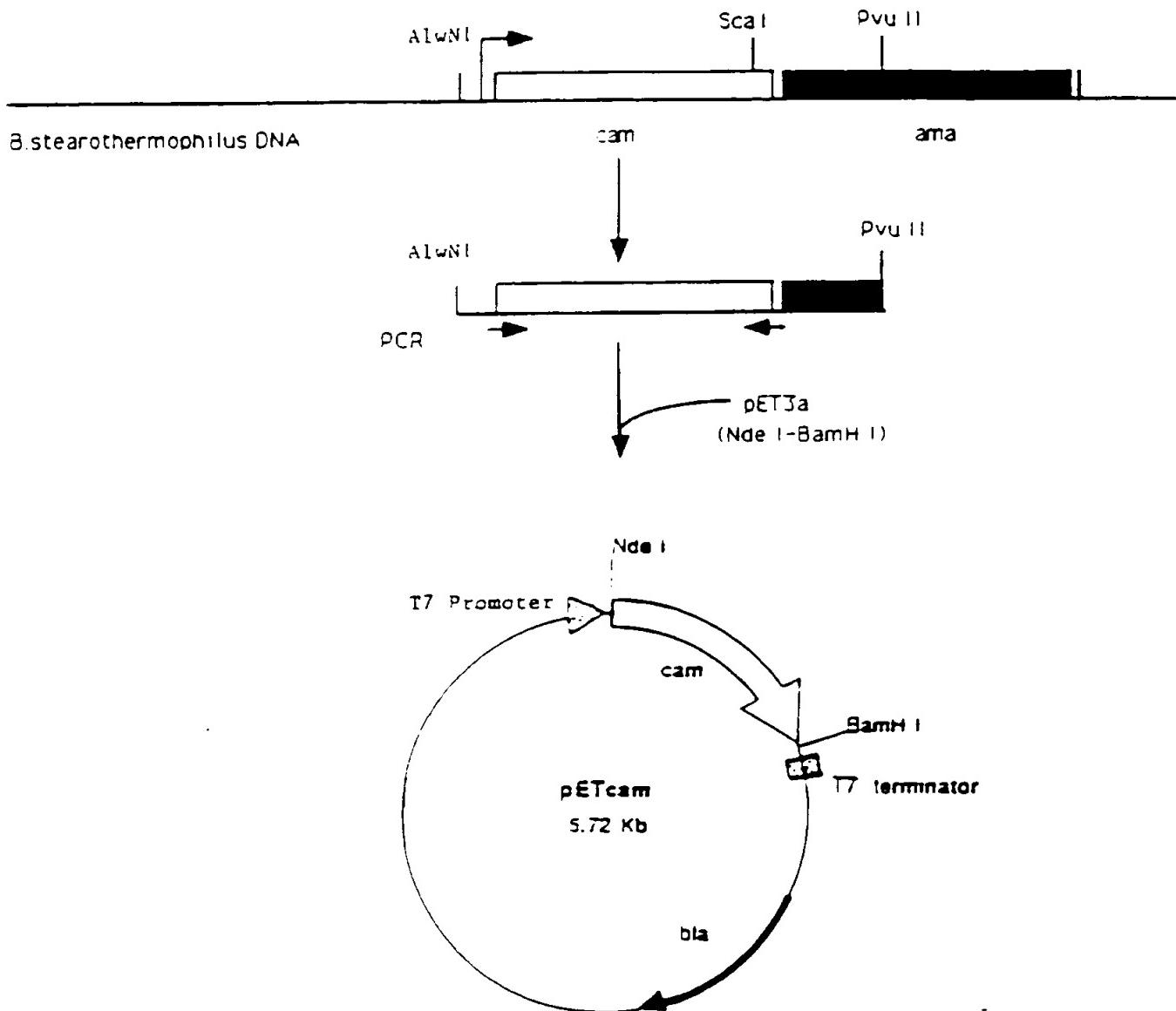
1. Acide aminé amidohydrolase possédant la séquence d'acides aminés représentée en SEQ ID N°1.
- 5 2. Acide aminé amidohydrolase caractérisée en ce qu'elle est issue de la souche *Bacillus stearothermophilus* NCIB8224 et est capable d'hydrolyser des dérivés N-carbamoyle acides aminés en L-acides aminés correspondants.
3. Séquence polynucléotidique caractérisée en ce qu'elle code pour une acide aminé amidohydrolase selon l'une des revendications 1 à 2.
- 10 4. Séquence selon la revendication 3 caractérisée en ce qu'il s'agit de la SEQ ID N°1.
5. ADN recombinant comprenant une séquence polynucléotidique selon la revendication 3 ou 4.
- 15 6. Vecteur d'expression à réplication autonome et/ou intégratif caractérisé en ce qu'il comprend une séquence polynucléotidique selon la revendication 3 ou 4.
7. Cellule recombinante contenant une séquence polynucléotidique selon la revendication 3 ou 4, un ADN recombinant selon la revendication 5 et/ou un vecteur d'expression selon la revendication 6.
- 20 8. Cellule selon la revendication 7 caractérisée en ce qu'il s'agit de préférence d'une bactérie.
9. Procédé de production d'une acide aminé amidohydrolase selon la revendication 1 ou 2 caractérisé en ce que l'on cultive une cellule recombinante selon la revendication 7 ou 8 et l'on récupère l'acide aminé amidohydrolase attendue.
- 25 10. Procédé selon la revendication 9 caractérisé en ce que l'expression du gène ou de l'ADN recombinant codant pour l'acide aminé amidohydrolase est placée sous contrôle d'un promoteur T7 dans la dite cellule recombinante.

11. Procédé pour l'hydrolyse enzymatique de N-carbamoyle L-acides aminés en L-acides aminés correspondants mettant en oeuvre une acide aminé amidohydrolase selon la revendication 1 ou 2 exprimée *in situ* ou non à partir d'une cellule selon la revendication 7 ou 8.

5 12. Procédé selon la revendication 11 caractérisé en ce que l'hydrolyse est effectuée en présence d'une quantité efficace de sels de cobalt.

13. Utilisation d'une acide aminé amidohydrolase selon la revendication 1 ou 2. ou d'une séquence selon la revendication 3 ou 4 pour la production enzymatique de L-méthionine.

FIGURE 1/1



REPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

2728905

~~N° d'enregistrement
national~~FA 508762
FR 9415838

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications mentionnées dans la demande enregistrée
Catégorie	Citation du document avec indication, au cas de besoin, des parties pertinentes	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHEES (C.I.C.O.)
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 120, no. 11, 14 Mars 1994 Columbus, Ohio, US; abstract no. 126432g, MUKOHARA, YUKUO ET AL. 'Molecular cloning and sequencing of the gene for a thermostable N-carbamyl-L-amino acid amidohydrolase from Bacillus stearothermophilus strain NS1122A' page 264; * abrégé *	1-9,11
D	& BIOSCI., BIOTECHNOL., BIOCHEM., vol. 57, no. 11, 1993 pages 1935-1937, ---	
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 118, no. 11, 15 Mars 1993 Columbus, Ohio, US; abstract no. 97136q, page 362; * abrégé * & JP-A-04 183 391 (NIPPON SODA) 30 Juin 1992 ---	1-9,11
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 120, no. 19, 9 Mai 1994 Columbus, Ohio, US; abstract no. 239858u, ISHIKAWA, TAKAHIRO ET AL. 'Microbial conversion of DL-5-substituted hydantoins to the corresponding L-amino acids by Bacillus stearothermophilus NS1122A.' page 502; & BIOSCI., BIOTECHNOL., BIOCHEM., vol. 58, no. 2, 1994 pages 265-270, ---	1-9,11, 13
		-/-
1	Date d'achèvement de la recherche 21 Septembre 1995	Examinateur Delanghe, L
EPO FORM 100-002 (PCU)	CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES X : particulièrement pertinents à lui seul Y : particulièrement pertinents en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinents à l'encontre d'un motif de revendication ou arrivée-pièce technologique générale O : divulgation non-torticelle P : document intercalaire T : cité en principe à la base de l'innovation E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a pas pu être joint à cette date de dépôt ou qui a une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : numéro de la même famille, document correspondant	

REPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLERAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIREétabli sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

2728905

N° d'enregistrement
nationalFA 508762
FR 9415838

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendications mentionnées dans la demande enregistrée	
X	DATABASE WPI Section Ch, Week 9252 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 92-428828 & JP-A-04 325 093 (NIPPON SODA CO), 13 Novembre 1992 * abrégé * ---	1-9, 11	
D, X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 120, no. 13, 28 Mars 1994 Columbus, Ohio, US; abstract no. 157385y, SAKANYAN, V. ET AL 'Gene cloning, sequence analysis, purification and characterization of a thermostable aminoacylase from Bacillus stearothermophilus.' page 483; * abrégé * & APPL. ENVIRON. MICROBIOL., vol. 59, no. 11, 1993 pages 3878-3888, ---	1	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (ex. CL. 9)
A	FR-A-2 383 961 (SNAM PROGETTI) 13 Octobre 1978 * revendications * ---	1	
A	EP-A-0 178 863 (SCHERING CORPORATION) 23 Avril 1986 * revendications * -----	10	
1	Date d'entrepreneur de la recherche 21 Septembre 1995	Rechercheur Delanghe, L	
EPO FONDS US EN SE (PNUCL)	CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES	T : théorie ou principe à la base de l'innovation E : document de brevet délivrant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date ou depuis ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons A : membre de la même famille, document correspondant	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'exception d'un motif une revendication en entière-plate technologique général O : divulgation non-tertiaire P : document intermédiaire			